

⑫ 公表特許公報(A)

平4-502611

⑬ 公表 平成4年(1992)5月14日

⑭ Int. Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 37/02  
7/00

識別記号  
ADU  
C  
D

庁内整理番号  
8317-4C  
9051-4C  
9051-4C※

審査請求 未請求  
予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

(全 11 頁)

⑮ 発明の名称 コラーゲンの架橋の抑制用化合物および抑制方法

⑯ 特 願 平1-510274

⑰ 出 願 平1(1989)9月28日

⑱ 翻訳文提出日 平3(1991)3月28日

⑲ 国 際 出 願 PCT/AU89/00422

⑳ 国際公開番号 WO90/06102

㉑ 国際公開日 平2(1990)6月14日

優先権主張 ㉒ 1988年9月28日 ㉓ オーストラリア(AU) ㉔ PJ0675

⑳ 発 明 者 グリッグ, ジョフレイ・ウォル オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェールズ 2066、レイン・ター  
コーヴ、バーンズ・ベイ・ロード 352

㉑ 出 願 人 ベプタイド・テクノロジー・リ、 オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェールズ 2099、ディー・ミテッド  
ファイ、インマン・ロード 4-10

㉒ 代 理 人 弁理士 萩 野 平 外3名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-4-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せから選ばれることを特徴とする、皮膚のコラーゲンの架橋および/または皮膚細胞のDNAに対する損傷を減少または防止する方法。

2. 活性化化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいはその組合せである請求の範囲第1項記載の方法。

3. 活性化化合物がカルノシンである請求の範囲第2項記載の方法。

4. 活性化化合物がもう1つの分子と結合させられ、該分子は組成物が皮膚浸透、皮膚適用および組織吸収に関して改善させられるようなものである請求の範囲第1項〜第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 分子がアミノ酸またはペプチドである請求の範囲第4項記載の方法。

6. 方法が皮膚への組成物の局所適用を含む請求の範囲第1項〜第5項のいずれか1項記載の方法。

7. 組成物が、ビリルビン、カロチノイド、マンニトール、還元グルタチオン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEおよびその組合せから選ばれる化合物を含む請求の

範囲第1項〜第6項のいずれか1項記載の方法。

8. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-4-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せからなる群から選ばれることを特徴とする、紫外線に曝すことによる皮膚のコラーゲンの架橋を減少または防止する方法。

9. 活性化化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいはその組合せである請求の範囲第8項記載の方法。

10. 活性化化合物がカルノシンである請求の範囲第9項記載の方法。

11. 活性化化合物がもう1つの分子と結合させられ、該分子は組成物が皮膚浸透、皮膚適用および組織吸収に関して改善させられるようなものである請求の範囲第8項〜第10項のいずれか1項に記載の方法。

12. 分子がアミノ酸またはペプチドである請求の範囲第11項記載の方法。

13. 方法が皮膚への化合物の局所適用を含む請求の範囲第8項〜第12項のいずれか1項記載の方法。

14. 組成物がビリルビン、カロチノイド、マンニトール、還元グルタチオン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEおよびその組合せからなる群から選ばれる化合物を含む

む請求の範囲第8項～第13項のいずれか1項記載の方法。

明 細 書

コラーゲンの架橋の抑制用化合物および抑制方法

#### 発明の分野

本発明はひふのコラーゲンの架橋および／またはひふ細胞DNAの損傷を減少または防止するための方法に関する。特に本発明は老化および／または紫外線照射に曝露に続く期間のコラーゲンの架橋を減少または防止する性能を有する特定のジペプチドおよびその類似体の使用に関する。本発明の方法はまた紫外線によるDNAの損傷を減少させるためにも適用できる。

#### 発明の背景

活性酸素種による酸化ストレスおよび組織の損傷はがんおよび老化を含む多数の疾患の基礎として示唆されてきた(HallinwellおよびGutteridge, 1985; Harman, 1987; Saul等, 1987参照)。

非常に反応性のフリーラジカルの濃度および生成は紫外線によって高められることが知られている。前記反応性種は後でDNA、RNA、たんぱく質および脂質と反応可能である。前記反応性種および潜在的に損傷を起す種に対する自然の防御機構が存在することが信じられ、そして老化防止性を持つ多数の分子が組織内に確認されてきた(たとえばビタミンE、カルノシンおよびアスコルビン酸)。しかしながら、生体内のカルノシンおよびその類似体の生理的な役割は不明のままである。

効率的な一重項酸素捕そく助であることに加えて、カルノシンに対して示唆された他の役割としては、乳酸の中和(Davey, 1960)、銅キレート剤(Brown, 1981)、ミオシン明パン沈殿ト

キソイド酵素の活性化因子(ParkerおよびBlag, 1980)および酵素の調節剤(池田等, 1980)が挙げられる。

哺乳動物の老化の間、未成熟したコラーゲンの架橋の量は増加するが、一方未成熟の減少可能な架橋の数は減少する(Ames, 1983)。他の組織の(たとえば腱)の架橋の性質は違いうるが、同様の一般的な傾向が存在する(Ames, 1983; Rattan等, 1982)。さまざまな種に対する架橋の量の変化の速度はいろいろな種に対する寿命の相違を反映すると思われる。たとえば、成熟した架橋HHL(ヒスチジンヒドロキシルシノノールロイシン)の量は40才までヒトのひふで一次的様式で上昇するが、一方子牛のひふではHHLの量は4才で平坦化する(Koehn等, 1988)。架橋は、酸化的に脱アミノされるコラーゲン鎖中の前駆体リシン(Visiooli等, 1983)またはヒドロキシルリシン(Boldyrev等, 1987)から生じる。生成されたアルデヒドはその後類似の残分と縮合してアルドールを生じるかあるいは隣接するリシンもしくはヒドロキシルリシン残分と縮合してシッフ系化合物を生じる。コラーゲンの架橋度はまた紫外線によって増大する。このようにコラーゲンの架橋速度とひふおよび恐らく他の組織の老化の速度の間には相関がある。

#### 発明の概要

本発明は、活性化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-L-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、

硝酸アセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体および前記のものの2種以上の混合物から選ばれることを特徴とする、皮膚のコラーゲンの架橋および／または皮膚細胞のDNAに対する損傷を減少または防止する方法からなる。

本発明の好ましい実施態様において、活性化合物は天然に生じる(たとえばヒトの組織に見出される)カルノシン(ペーアラニル-L-ヒスチジン)のような老化防止化合物である。

目下、活性化合物はカルノシンまたはその組合によるホモカルノシンであることが好ましく、最も好ましくはカルノシンである。

本発明の更に好ましい実施態様において、活性化合物はもう1つの分子に結合させられ、その分子は組成物がひふ浸透、ひふ適用および組織吸収に関して改良されるようなものである。この別の分子はアミノ酸またはペプチドであることが好ましい。

本発明の方法は一般にひふへの組成物の局部適用を含むものであるが、しかしながら、組成物は皮下もしくは筋肉内に注射でき、または経口的に飲用できる。組成物中の活性化合物の速度は投与の経路に依存するものであり、内科医の指示で行われるが、しかしながら、活性化合物の濃度はたとえばひふクリーム処方物の乾当り1～100mgの範囲内であることが予想され、好ましい範囲は3～20mg/gである。

本発明の方法は、紫外線または日光に曝露することによるコラーゲンの架橋を減少または防止することによって皮膚の老化を低下させるものと信じられる。その方法はまた紫外線の結果としてのDNA損傷を防止することができるということを生じさ

せるので、本発明の方法は皮膚ガンの防止に適用可能性を有する。

本発明に係る化合物は、上文で議論した活性ペプチド分子に加えて、コラーゲンの架橋を阻止または防止できる非ペプチド化合物を含む。本発明の組成物中に都合よく含むような化合物としてはビリルビン、カロテノイド、マンニトール、還元グルタミン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンCおよびビタミンEが挙げられる。

#### 本発明の詳細な記述

本発明の本質をさらに明りょうに理解するために、次にその好ましい態様を次の実施例を参照して記述する。

#### 実施例1

##### マウス皮膚実験

カルノシンのコラーゲン架橋抑制活性の例を表2に示しそしてマウスの皮膚の全還元可能種に対する紫外線照射の影響を表1に示した。

L-カルノシンはシグマケミカル社 (Sigma Chemical Company) またはBDHケミカル社 (BDH Chemical Ltd.) から入手した。Chromar HPLC等級アセトニトリルをMallinkrodt Australia Pty. Ltd. から得て、すべての溶媒を濾過し使用前に脱気した。比放射能50~70キユーリー/ミリモルのKB(H<sub>2</sub>)をオーストラリア原子力委員会を通して、CEA Franceから購入した。

皮膚線維芽細胞をSwiss マウスから得た組織の原始体外移植組織から培養した。細胞をDulbeccoの変性Eagles増地 (Gibco)

ラムで35℃の温度および1.0ml/分の溶媒流速で行なった。カラム寿命を得る管路中にBrownlee 4.6×30mmアミノ-Spheri 5 プレーカラムガードカートリッジ、およびBrownlee 15×32mm Anion Newguard を使用することによりかなり延ばした。Brownlee カラムはオーストラリアのActivon Scientific Products Co Pty. Ltd. により供給された。

勾配系は2種の溶媒から成る。溶媒AはpH4.3、10mMリン酸カリウム緩衝液を含み、そして溶媒Bは水で50:7 (v/v) に希釈したHPLC等級アセトニトリルを含んでいた。アミノ酸を先行技術と同様の勾配プログラムを使用することにより分離しうるが、プログラムを還元したコラーゲン成分の分離のために修正した。

プログラム1は次の通りであった。すなわち、1.95%溶媒Bで5分間；2.直線勾配95%~70%溶媒Bで15分間にわたって；3.直線勾配70%~50%溶媒Bで15分間にわたって；4.50%溶媒Bで10分間；5.直線勾配50%~95%溶媒Bで5分間にわたって。

容積0.5mlの試料を20mlシンチレーション小瓶中へ直接収集し、Amersham PCS II 高効率相化シンチレータ剤5.0mlを添加した。計数をLKB 1215 Rack beta II 計器で行なった。

中で培養し10%牛胎児血清 (Gibco Systems Pty. Ltd.) を含む第2世代と第3世代の間に使用した。皮膚切片もまた新生児Swiss マウスから得た。切片はできるだけ多くの皮下物質を切り取り、次の実験手順の前にリン酸塩緩衝食塩水で簡単にすすぎ落した。すべての試料を紫外線処理に先立ってリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) 中のL-カルノシンのさまざまな濃度中で1時間37℃でインキュベートした。ホウ水素化合物による還元は先立って、試料をPBS中40℃でよく洗浄し、コラーゲン構造を最小の損傷に抑えて汚染されているタンパク質、グリコプロテイン、グリコサミノグリカンを除いた。

皮膚切片および皮膚線維芽細胞の開放皿を24ワット殺菌紫外線ランプを使用して920W/cmに3時間さらした。試料は紫外線処理を通して水分を保持した。

KB(H<sub>2</sub>)による還元を室温で同種のPBS緩衝液中1時間試料/ホウ水素化合物の100:1湿式重量比で行なった。反応を4M酢酸の添加により停止しpHを3.00に下げた。次に試料が可溶性放射能がなくなるまで蒸留水に対して4℃で透析した。試料をSequanal等級5N塩酸中で窒素のもと22時間110℃で加水分解した。それぞれの試料をその後蒸留水に溶解させる前に蒸留水からロータリエボレーターで2度乾燥させた。水解物をHPLCの前に0.5N NaOHで中和した。

HPLCをP3500HPLCポンプ、LCC500プログラマーを含んでなるハーマシア (Pharmacia) HPLC/FPLC装置で、加熱カラム室を使用して行なった。

初めての分離をBrownlee 25cm×0.46cmアミノ-Spheri 5カ

#### 幼若マウスの皮膚の全還元可能種

表1

組織	紫外線処理	総(3H)CPM
皮膚切片		
皮膚(外面)	-	10000
皮膚(外面)	+	24000
皮膚(内面)	-	11000
皮膚(内面)	+	27000
皮膚細胞		
線維芽細胞	-	19000
線維芽細胞	+	38000

2mgの試料を通常光線または紫外線で2.5時間処理し次にKB(H<sub>2</sub>)で還元し、HPLCに先立って加水分解した。

表2

#### カルノシンによる紫外線誘起コラーゲン架橋の反転

組織	紫外線処理	カルノシン	総(3H)CPM
皮膚切片	-	-	15000
	+	-	23000
	+	+	14000
皮膚細胞	-	-	14000
	+	-	20000
	+	低線量(2mM)	14000
		高線量(10mM)	10000

試料をカルノシン溶液によって保護または保護なしで表1のように処理した。

**実施例2****皮膚線維芽細胞実験**

マウス皮膚線維芽細胞(MDF)の1次培養を新生マウス皮膚から分離し、実験前のわずか4世代にすぎない間ずっと10%牛胎児血清を加えた高グルコースを持ってDMEM培地中を連続的に通過させた。紫外線露光に先立って、細胞層をPBS50mlで洗浄して成長培地のすべての痕跡を除去した。MDFを次に10mMカルノシンを加えてまたは加えずに1時間37℃でPBS25mlとともにインキュベートした。すべての手順を外部光線に対し最小露光で行なった。

インキュベーション期間の終りに複製細胞集団を紫外線に0、2、4または6分間露光した。照射に続いて細胞単分子層をはがしPBSを含有する遠心分離管へ移した。遠心分離後上澄を除去し、細胞沈殿物をPBS30ml中へ再懸濁した。すべての試料を次いで3日間4℃で洗浄した。PBSを毎日2回取り替えた。

試料を次にKB(<sup>3</sup>H)で還元し酸加水分解した。加水分解溶液をロータリーエバポレーターにかけ、中和してHPLC分析(Smolenski等、1983 Biochem J.、213、523-532頁)前に凍結乾燥した。0.5mlのHPLC西分を20mlシンチレーション小瓶中へ直接収集し、Amersham PCS II高効率相化合物シンチレート剤5mlを添加した。計数をLKB 1215 Pack Beta IIで行なった。これらの実験結果を第1図～第6図に示す。

マウス皮膚線維芽細胞をこすり取ってPBSで洗浄した。分離した細胞懸濁液を次に記述した方法を使用してHPLCのた

るプロフィルの比較を示す。西分55-75からのピークの減少により見られるようにカルノシンが紫外線Aの影響からMDF細胞を保護していることがプロフィルのこの重なりから明白である。

**要約**

10mMカルノシンが紫外線Aに露光している間中MDFを浸す溶液中に存在するとき、生成した変化した還元可能な架橋の生成に70%の減少があった。これをHPLCプロフィルの様子により例示した。すなわち6分間の紫外線A露光+10mMカルノシンのプロフィルは2分間紫外線A露光のプロフィルに類似していた。

**実施例3****紫外A光線使用ヒト線維芽細胞(MRC-5)実験**

ヒト肺線維芽細胞細胞系(MRC-5)を紫外A光線に露光したときカルノシンがヒトコラーゲンに与える保護の程度を実験するために使用した。

線維芽細胞は動物の結合組織の維持のための責任がある。それらは積極的に間質空間中へコラーゲンプロペプチドを分泌し、その一部分は結合組織コラーゲンとして細胞外基質中に沈着する。

MDF細胞のために使用したものと同様の実験計画をこれらの実験において使用したが、紫外線A露光時間を15分間に増加した。これはMDF細胞の6分間紫外線A露光で明白であったコラーゲン架橋の変化を増加させるために行なった。これらの実験の結果を第7図～第10図に示す。

めに処理した。

第1図に示したプロフィルは典型的な非紫外線照射試料(対照)の描写である。範囲40-90の西分は分離した還元可能なコラーゲン架橋から成る。ピーク高さの相違は試料中に存在する特定な型の架橋アミノ酸錯体の量の表示である。

第2図に示したプロフィルは紫外A光線に2分間露光後の分離した架橋における変化を描いている。西分番号55の主ピークが消失し西分83-87へピークの位置移動があった。

これらの相違は水分子に対する紫外線の作用により生じたフリーラジカルの相互作用による架橋アミノ酸錯体の変更を要するものであると推測される。

第3図に示したように紫外A光線に4分間露光後還元可能な架橋のプロフィルは西分55-75の範囲の架橋性アミノ酸錯体の大きな増加を示した。

第4図に示したように、紫外線A露光6分後では西分55-75に存在する還元可能な架橋アミノ酸錯体の含有量に著しい変化があった。これはたぶん西分55-75における蓄積を引き起こすより少ない錯体架橋の変更およびことによるとフリーラジカルの相互作用による全く新しい架橋の形成の結果である。

第5図はマウス皮膚線維芽細胞を10mMカルノシンの存在において6分間紫外線Aに露光したときに得られた結果を示した。そこで見られるように第4図に示したものと比較して分離した架橋のプロフィル中に著しい相違があった。

第6図はMDF細胞を2分間紫外線Aにまたは6分間紫外線Aのほかに10mMカルノシンの存在下において露光したとき生ず

る第7図では、MDFの集団と同様の細胞数でMRC-5の集団をこすり落としHPLCのために処理した。これらの細胞は紫外線Aで処理しなかった。すなわち対照でありそのプロフィルはMDF細胞により生じたものと同様であったが相違があった。主コラーゲン架橋ピークが西分40-90の範囲にあった。

第8図は10mMカルノシンの存在においてMRC-5細胞を15分間紫外A光線に露光したとき得られたHPLCプロフィルを示す。そのプロフィルは対照(第7図)のプロフィルと同様であってカルノシンがない時の15分間紫外線A露光(第9図)のものと大きな違いであった。

第9図はMRC-5細胞を15分間紫外A光線に露光したとき生じたプロフィルを示す。西分40-90の範囲は細胞質のコラーゲン中に新たに生じた架橋錯体の推定上の取り込みが広く増加した兆候である。

第10図はMRC-5対照から、および10mMカルノシンの存在下において15分間紫外線Aに露光後のMRC-5から分離したHPLCプロフィルの重なりを示す。さらに、2種類のプロフィルの間にはずいぶん類似点がありカルノシンがフリーラジカル攻撃作用からコラーゲンを保護していることを示している。

**要約**

これらの実験からの結果はまたカルノシンが紫外線A誘起架橋に対してコラーゲンを保護するという仮定を支持した。これはMRC-5対照HPLCプロフィルとカルノシンの存在下において15分間紫外線Aに露光したMRC-5細胞のプロフィルの間の注目すべき類似点により示された。また、カルノシン不

在で紫外線A露光をしたMRC-5細胞から得られたプロフィールにおける著しい変化はカルノシンが架橋に対するコラーゲンのその保護においてきわめて有効であることを示すものである。紫外線A露光時間を150%増加したこれらの実験は依然として10mMカルノシンで70%より大きい保護を照明了。

#### 実施例4

##### ラット尾臓実験

等尺性融解はコラーゲンの年齢関連変化数を決定するために広く使用されてきた(MitchellおよびRigby, 1975 BBA, 393, 531~541頁), RobinsおよびBailey (1975 Biochem J, 149, 381~385頁)はコラーゲン架橋の密度は時間では一定であるが老化するにつれて生じ、リジンおよびヒドロキシリジンから生成した不安定な還元可能なアリジミン結合が、年齢関連コラーゲン変化を説明する熱的に安定で、還元不可能な結合に転換するということを提唱した。

等尺性融解のこの方法はどのように紫外線がコラーゲン架橋を変化しうるかを実験するために使用した。多数の他のコラーゲン老化研究(MitchellおよびRigby, 1975 BBA, 393, 531~541頁; Rigby およびMitchell, 1978, BBA, 532, 65~70頁およびBBA, 554, 62~68頁; Rigby など, 1977, BBR C, 79(2), 400~405頁)のために使用されてきたラット尾臓をこれらの実験において使用した。

この方法はそのまま年齢関連架橋変化の直接測定基準として他の方法以上に多くの利点を有す。本出願は光老化および特に紫外線によるコラーゲン架橋に関連を持っているので、この方

分析のための臓を等尺性装置に取り付け前に3cmの標準長さに再切断した。取り付けた臓を次に20℃のPBS浴中へ浸漬し、1gの重力を適用した。15分間の緩和期間後装置の向きを変えて融解が生じるまで1℃/分の割合で温度を上昇した。最終測定を次にチャート記録計から得た。

臓架橋における測定可能な変化を生じるために必要な露光時間を測定するために、時間経過実験を行なった。この実験の結果を第11図に示す。4本の紫外線A管と2本の紫外線B管から成る光源を使用する180分間の露光は再生可能な結果を与えたことがわかった。この時間は次の実験のために使用した。

カルノシン、ホモカルノシンおよびアンセリンを複製臓を前処理するために使用した。これらを次に180分間紫外線Aに露光した。これらの実験からの結果を第12図に示す。これらの実験においてカルノシンおよびホモカルノシンは10mMおよび100mMで紫外線誘起架橋に対して臓を効果的に保護した。一方アンセリン10mMでは全く保護効果が観察されなかったが、アンセリンは高濃度で保護効果を与えうることが信じられる。(あいにくアンセリンは入手可能性の欠除のため高濃度での試験はしなかった。)

第13図は他のジペプチドおよびトリペプチドの1セットをカルノシンと比較して紫外線誘起架橋に対して臓を保護するための能力を試験したとき得られた結果を示す。試験したそれらのいずれも紫外線誘起架橋に対して臓を保護しないことがわかった。ペプチドの2種類はヒスチジンを含有していたが依然不活性であった。これらの結果はカルノシンがたぶん紫外線誘起コ

法は時間による紫外線架橋の範囲の定量的測定をすることを可能にする。さらに、この方法は紫外線誘起フリーラジカルに対する臓の保護におけるカルノシンおよび他の酸化防止剤の効果測定を可能にする。

#### 材料および方法

等尺性融解の技術を光老化の影響を測定するためにラット尾臓に適用した。

90日経過Sprague-Dawleyラットをこれらの実験で使用した。

#### 臓の分離

尾を摘出により切除し永凍けにして作業所へ移動した。臓を次に乾燥を防ぐために生理食塩水で濡らせた外科用パッド上で注意深く解凍した。各々の臓をその後測定し半分に分けた。尾の上半分を実験用として使用し一方で下部を物理的対照として4℃で保存した。

#### 紫外線照射および等尺性測定

臓の実験用半分を紫外線露光に先立って20時間適切な試験溶液中で4℃でインキュベートした。この露光に続いて臓をPBSで洗浄し、分析するまで4℃で保存した。

ひずみ計-Shinkbo 変換器型式UL-100gm から成る等尺性装置を増幅器に接続した。ひずみ計に取り付け後試料をPBSを含有するジャケット式バイレックス浴中に浸漬した。実験の間じゅうその浴をTanson循環水加熱器で加熱した。温度上昇を測定するためにFLUK熱電対型式80TXを臓取り付け位置の隣の部分へ取り付けた。力および温度の測定をICI DP 600 2本ペンチャート記録計で同時に記録した。

ラゲン架橋に対して保護するためにその酸化防止性によって作用していることを示唆する。

第14図はグルタチオン10mM(10GSH)に対するSm測定に関する第12図からの臓データとの比較を示す。グルタチオンはこの測定方法を使用するとさらに効果があると思われる。アンセリン(10A)はこの濃度では作用しない。グルタチオンはこの濃度では生体内でフリーラジカル捕そく剤としての作用に有効ではないものであるということを注目することが重要である。

#### 要約

等尺性融解技術を使用するこれらの実験からの結果は、カルノシンが紫外線誘起コラーゲン架橋に対してラット尾臓保護において効果的に作用することを決定的に証明した。また試験した他のジペプチドおよびトリペプチドの結果から、カルノシン効果は明確でありその酸化防止性のために生じることもまた明白である。

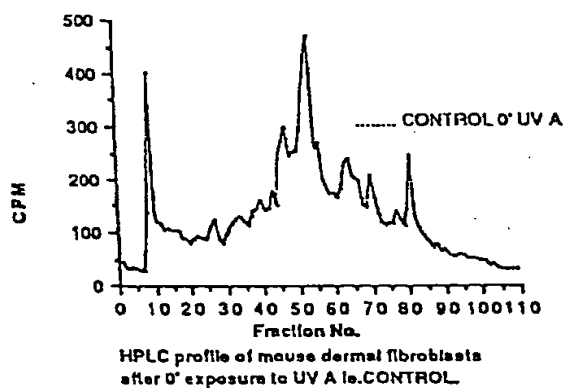
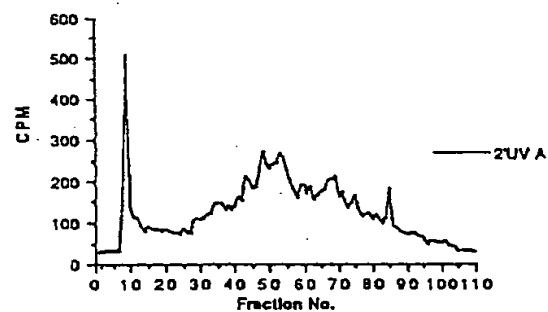


Figure 1.



Figure,2.

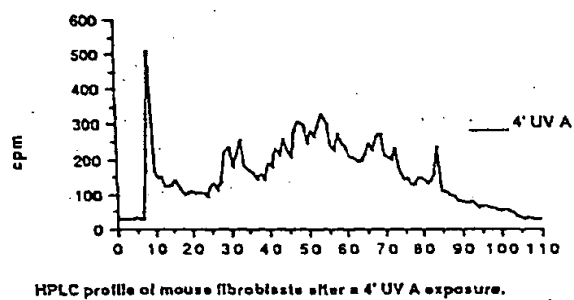
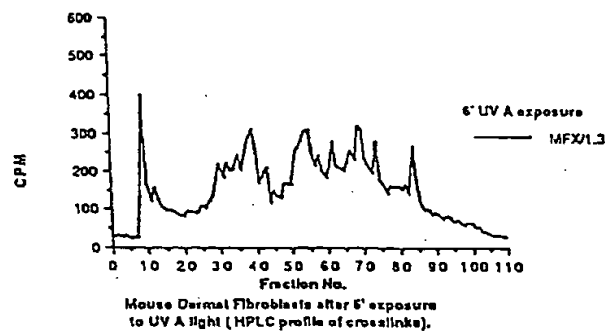
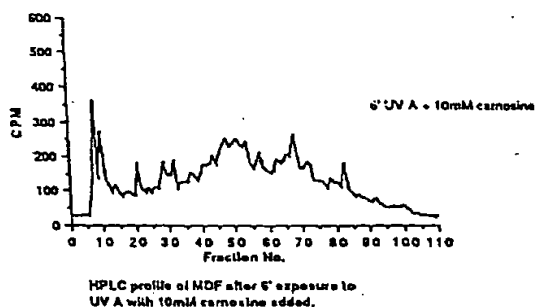


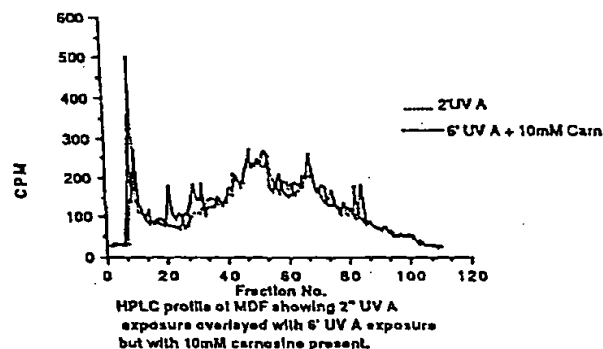
Figure ,3.



Figure,4.



Figure,5.



Figure, 6.

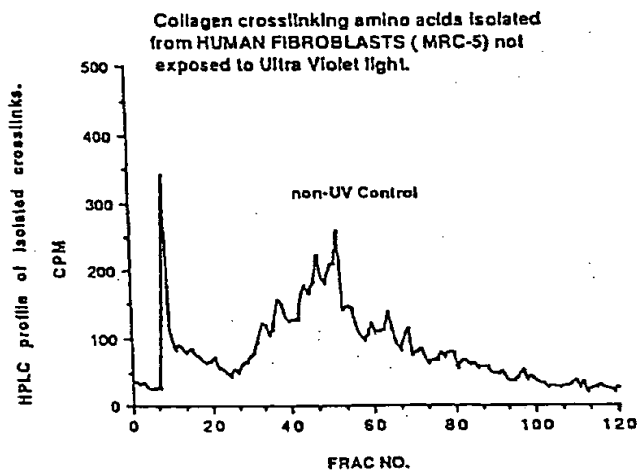
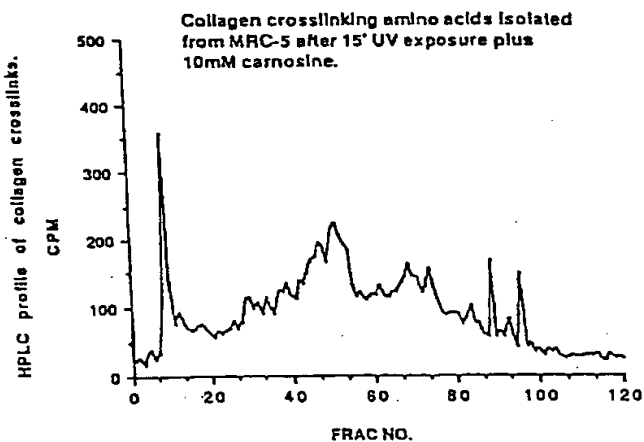


Figure ,7.



Figure,8.

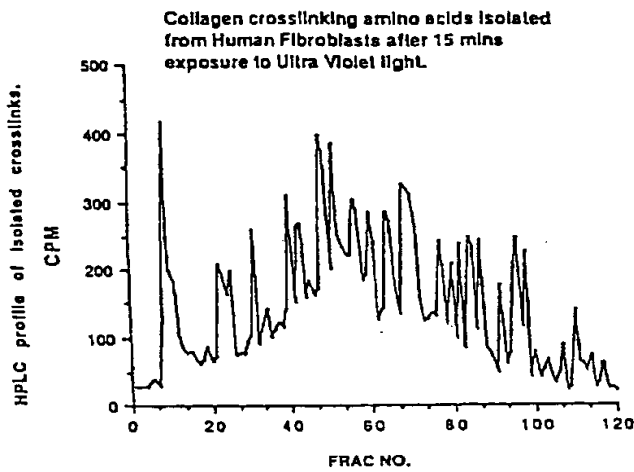
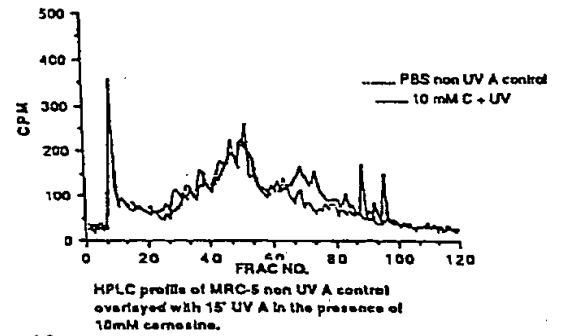
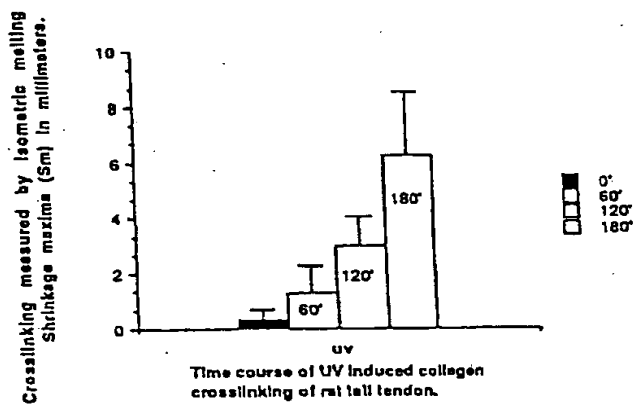


Figure.9.



Figure,10.



FIGURE,11.

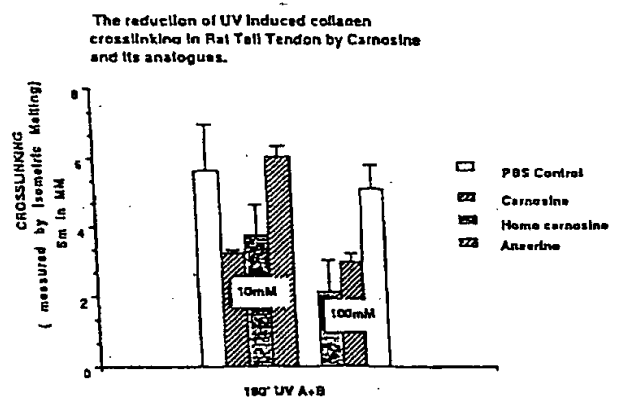


FIGURE 12



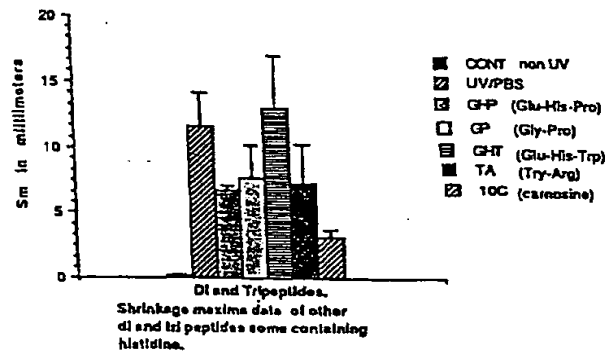


Figure 13.

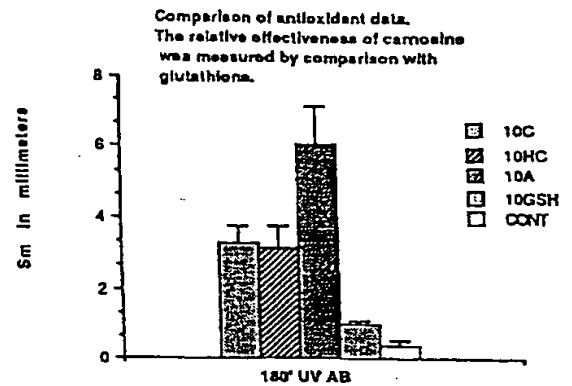


FIGURE 14

補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条の8の規定による補正書)

平成3年3月28日

特許庁長官 殿

1. 国際出願番号

PCT/AU 89/00422

2. 発明の名称

コラーゲンの架橋の抑制用化合物および抑制方法

3. 特許出願人

名称 ペプタイド・テクノロジー・リミテッド (ほか1名)

4. 代理人

住所 〒100

東京都千代田区霞が関3丁目8番1号  
虎の門霞が関ビル14階

栄光特許事務所

電話03(3581)-9601 (代通)

氏名 井理士 (7387)

萩野 平

(ほか3名)

5. 補正書の提出年月日

1990年11月26日

請求の範囲

1. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-L-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せから選ばれることを特徴とする、皮膚のコラーゲンの架橋を減少または防止する方法。

2. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-L-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せから選ばれることを特徴とする、皮膚細胞のDNAに対する損傷を減少または防止する方法。

3. 活性化化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいはその組合せである請求の範囲第1項または第2項のいずれか1項に記載の方法。

4. 活性化化合物がカルノシンである請求の範囲第3項記載の方法。

5. 活性化化合物がもう1つの分子と結合させられ、該分子は組成物が皮膚浸透、皮膚適用および組織吸収に関して改善させ

られるようなものである請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

5. 分子がアミノ酸またはペプチドである請求の範囲第5項記載の方法。

7. 方法が皮膚への組成物の局部適用を含む請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項記載の方法。

8. 組成物が、ビリルビン、カロテノイド、マンニトール、還元グルタチオン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEおよびその組合せから選ばれる化合物を含む請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項記載の方法。

9. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-4-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せからなる群から選ばれることを特徴とする、紫外線に曝すことによる皮膚のコラーゲンの架橋を減少または防止する方法。

10. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-4-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシカルノシン、その類似体およびその組合

せからなる群から選ばれることを特徴とする、紫外線に曝すことによる皮膚の皮膚細胞DNAに対する損傷を減少または防止する方法。

11. 活性化化合物と組合せた適切な賦形剤を含む組成物で皮膚を治療することを含んでなり、前記活性化化合物がカルノシン、ホモカルノシン、アンセリン、3-メチル-4-ヒスチジン、L-アラニル-L-チロシン、アシルホモカルノシン、アセチルカルノシン、ヨードカルノシン、ジヨードカルノシン、硝酸アンセリン、カルベノキシロンカルノシン、その類似体およびその組合せからなる群から選ばれることを特徴とする、皮膚ガンの危険を減少または皮膚ガンを防止する方法。

12. 活性化化合物がカルノシンまたはホモカルノシンあるいはその組合せである請求の範囲第9～第11項のいずれか1項に記載の方法。

13. 活性化化合物がカルノシンである請求の範囲第12項記載の方法。

14. 活性化化合物がもう1つの分子と結合させられ、該分子は組成物が皮膚浸透、皮膚適用および組織吸収に関して改善せられるようなものである請求の範囲第9項～第13項のいずれか1項記載の方法。

15. 分子がアミノ酸またはペプチドである請求の範囲第14項記載の方法。

16. 方法が皮膚への化合物の局部適用を含む請求の範囲第9項～第15項のいずれか1項記載の方法。

17. 組成物がビリルビン、カロテノイド、マンニトール、還

元グルタチオン、セレン、尿酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEおよびその組合せからなる群から選ばれる化合物を含む請求の範囲第9項～第16項のいずれか1項記載の方法。

国際調査報告

International Application No. PCT/JP 89/00432

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If search classification differs from IPC, indicate also 5)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC Int. Cl. A61K 7/40, 7/46, 37/02		
II. FIELD SEARCHED		
National Documentation Searched		
Classification System		
IPC	A61K 7/40, 7/46, 37/02	
Documentation Searched other than National Documentation In the extent that such documents are included in the field searched		
All IPC as above		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Class No. 11
A	Derwent Abstracts accession no. 83-61824/43, Class B04, 2P, A, 30-104318 (MAGAL S.), 29 September 1983 (29.09.83)	
A	EP, A, 343421 (MAGAL KINERDRO), 17 January 1985 (17.01.85)	
A	GB, A, 2143732 (MAGAL KINERDRO), 20 February 1985 (20.02.85)	
* Special categories of cited documents: 16		
"a" Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "b" Document published on or after the international filing date "c" Document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "d" Document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "e" Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"f" Document published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "g" Document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "h" Document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step upon the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "i" Document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the latest completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
5 January 1990 (05.01.90)	15 January 1990	
International Searching Authority	Signature of authorizing officer	
Australian Patent Office	STEVEN CHU	

Form PCT/JP 89/10 (second sheet) (January 1989)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON  
INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/AU 89/00422

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Members
GB 2143732	DE 3424997	JP 60016926

END OF ANNEX

第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号
A 61 K 7/00	ADU H	9051-4C
	F	9051-4C
	W	9051-4C
		7252-4C
C 07 D 233/64	1 0 6	7180-4C

⑥発明者 ハナン、ガリー・ノエル

オーストラリア国 ニュー・サウス・ウェールズ 2111、ボロニア・パーク、アール・ストリート 32

⑦出願人 コモンウェルス・サイエンティフィック・アンド・インダストリアル・リサーチ・オーガニゼイション

オーストラリア連邦 オーストラリアン・キャピタル・テリトリー 2601、キャンプベル、ライムストーン・アヴェニュー (番地なし)